

FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN BIOLOGÍA
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO [2018-2019]

TÍTULO:

TERAPIA GÉNICA MEDIANTE SISTEMAS CRISP-CAS

AUTOR:

DANIEL GARCÍA TORRES

Resumen

En los últimos años los sistemas CRISPR-Cas han aparecido como una nueva herramienta para investigar y modificar el genoma. La facilidad para la creación de bases de datos de ARN guía, encargado de dirigir el corte generado por las nucleasas, permite realizar fácil y eficazmente investigaciones sobre la función del genoma, transcriptoma y epigenoma. Más recientemente y en especial con el uso de CRISPR-Cas9, esta tecnología ha comenzado a utilizarse para tratar enfermedades humanas con el objetivo de corregir las mutaciones en el ADN, que van desde una base hasta grandes deleciones, y son las causantes de algunas enfermedades hereditarias. Modificaciones de Cas9 han permitido realizar al sistema prácticamente todo tipo de modificaciones en el ADN de forma precisa. Además, CRISPR-Cas9 también es utilizado en el área de la inmunología para tratar enfermedades provocadas por virus o, para promover y dirigir la acción de las células del sistema inmunitario. En este trabajo se describirá el estado actual de la herramienta CRISPR-Cas y se hablará de su uso en terapia génica en humanos, de la cual no existen actualmente tratamientos aprobados y se encuentra en una fase muy temprana de ensayos clínicos. Además, mediante programas informáticos de acceso libre se realizará una simulación de un protocolo para tratar la enfermedad de Stargardt, una enfermedad causada por una mutación en un solo gen, mediante CRISPR-Cas. Con esto se pretende demostrar que CRISPR-Cas es una herramienta con grandes capacidades para tratar enfermedades que todavía se encuentra en una fase muy temprana de desarrollo pero se prevé que en un futuro no muy lejano será utilizada de forma rutinaria en el área de la medicina y la biotecnología.

Palabras clave: CRISPR; Cas9; terapia génica; sgRNA.

Abstract

In last years, CRISPR-Cas systems have appeared as a new tool to investigate and edit the genome. The facility to create guide RNA databases, responsible for directing the cut generated by the nucleases, allows easy and effective research on the function of the genome, transcriptome and epigenome. More recently, specifically with the use of CRISPR-Cas9, this technology has begun to be used to treat human diseases, with the objective of correcting mutations in DNA, like nucleotide changes or large deletions, that are the cause of some hereditary diseases. Modifications of Cas9 have allowed practically all types of precise DNA alterations. In addition, CRISPR-Cas9 is also used in the area of immunology to treat diseases caused by viruses or, to promote and direct the action of cells of the immune system. In this bibliographic review, the current status of the CRISPR-Cas tool and its use in gene therapy in humans will be described. There are currently no approved treatments using CRISPR-Cas and it is in a very early stage of clinical trials.. In addition, a protocol to treat Stargardt disease, a disease caused by a single gene mutation, using CRISPR-Cas will be simulated by free access software. This will demonstrate that CRISPR-Cas is a tool with great capacities to treat diseases that is still in a very early stage of development but it is expected that in a few years it will be used routinely in the area of medicine and biotechnology.

Key words: CRISPR; Cas9; gene therapy; sgRNA.

Glosario de abreviaturas:

Por orden de aparición:

- c-NHEJ: terminación canónica no homóloga.
- alt-NHEJ: terminación canónica no homóloga alternativa.
- HR: recombinación homóloga.
- HDR: recombinación homóloga directa.
- TALENs: nucleasas de actividad similar a activadores de la transcripción.
- ZFNs: nucleasas dedos de Zinc.
- CRISPR-Cas: agrupaciones de nucleasas asociadas a repeticiones cortas palindrómicas regularmente interespaciadas.
- PAM: motivo adyacente al protoespaciador.
- crRNA: ARN de CRISPR.
- tracrRNA: ARN trans-activado.
- sgRNA: ARN guía individual.
- psiRNA: ARN de silenciamiento procariótico.
- DSB: roturas en la cadena doble de ADN.
- dCas9: Cas9 sin nucleasa.
- CRISPRi: CRISPR de interferencia.
- CRISPRa: CRISPR de activación.
- AAV: virus adeno-asociados.
- Células CAR-T: células T con receptor de antígeno quimérico.
- LLCT: leucemia/linfoma de células T.
- HSCs: células troncales hematopoyéticas.
- HbF: hemoglobina fetal.
- ssODN: oligonucleótido donador de cadena simple.

- APOBEC: enzima editora de la apolipoproteína B mediante ARNm semejante al polipéptido catalítico.

- UGI: inhibidor de la uraciloglicosidasa.

Índice

1. Objetivos.....	1
2. Introducción	1
2.1 CRISPR.....	2
2.2 Proteínas asociadas a CRISPR o Cas	4
2.3 Cas9	5
2.3.1 Regulación de la transcripción	6
2.3.2 Modificaciones epigenéticas	7
2.3.3 Cambios específicos de nucleótidos.....	7
2.3.4 Detección de mutagénesis	8
2.4 Métodos para introducir CRISPR/Cas9 in vivo	9
3. Metodología	11
4. Análisis e integración de la información	13
4.1 Primeras pruebas con CRISPR-Cas9 en humanos.....	13
4.2 Ensayos clínicos.	13
4.2.1 Ensayos en tejidos sólidos.	13
4.2.2 Ensayos en tejidos no sólidos.....	14
4.3 Simulación práctica.	18
4.3.1 Diseño del sgRNA.....	18
4.3.2 Modificación del nucleótido mutado.	22
4.3.3 Introducción del sgRNA y el sistema de edición en los pacientes.....	24
5. Conclusiones.....	26
6. Bibliografía.....	28

1. Objetivos

En esta memoria se plantean dos objetivos principalmente. En primer lugar, describir el estado actual de los sistemas CRISPR-Cas9 y su uso en la terapia génica en humanos. Y como segundo objetivo diseñar un procedimiento para tratar una enfermedad mediante la terapia génica, en este trabajo se ha elegido la enfermedad de Stargardt (OMIM ID: 248200) causada por mutaciones puntuales en el gen *ABCA4*, cuya deficiencia genera daños en el epitelio pigmentario de la retina y provoca una pérdida de la visión progresiva. Se ha elegido esta enfermedad por ser monogénica y similar a otras estudiadas para su tratamiento con CRISPR-Cas y, por tanto, una buena candidata para ser tratada con terapia génica.

2. Introducción

Los genes son fragmentos de ADN que contienen la información para generar un producto funcional y son la base de la herencia de los seres vivos. En ocasiones aparecen mutaciones en estas moléculas que provocan alteraciones en el genotipo y, si llegan a expresarse, en el fenotipo del organismo en el que ocurre, pudiendo originar cambios positivos, neutros o negativos, estando entre estos últimos los que llamamos “enfermedades monogénicas”. La terapia génica busca corregir estos cambios perjudiciales evitando así que sus características negativas lleguen a expresarse y por tanto eliminar la enfermedad.

Así pues, en esta memoria, se describe el estado actual de la ingeniería genómica mediante la herramienta CRISPR-Cas, su importancia, sus bases y aplicaciones y sus perspectivas futuras. A la par, se propone, como vertiente práctica del trabajo, el diseño de uno de los componentes de la herramienta, el RNA guía, con el fin de abordar la reparación de la mutación causante de la anemia falciforme.

Las mutaciones en el ADN pueden ocurrir por la exposición a radiación ionizante, por agentes químicos, por errores durante la replicación del ADN o provocadas por una endonucleasa (Salsman y Dellaire, 2016). En las células existe una maquinaria molecular, destinada a reparar estos errores, que pueden ser la base de edición genética. Hay 3 vías principales por las que las mutaciones en la doble hélice son corregidas: terminación canónica no homóloga (c-NHEJ), terminación canónica no homóloga alternativa (alt-NHEJ) y recombinación homóloga (HR). Las vías de los NHEJ se activan con el ciclo celular y por ello son la vía de reparación más común, pero es propensa a generar fallos que resultan en inserciones o deleciones. Por otro lado la HR se inicia en la fase S o G2 del ciclo celular cuando la cromátida hermana puede ser utilizada como

molde para reparar el fragmento de ADN afectado, si se utiliza ADN exógeno para realizar la reparación, entonces hablamos de recombinación homóloga directa (HDR) lo que se utilizó a principio de los 80 para insertar y reparar genes en embriones de ratón (Salsman and Dellaire, 2016). La HDR requiere de ADN suministrado exógenamente que contenga una secuencia homóloga a la que flanquea la rotura en la cadena doble (DSB). Con lo que la secuencia que se busca introducir puede incorporarse en el locus correspondiente de la célula, permitiendo la modificación precisa de secuencias genómicas (Rouet, Smih y Jasin, 1994). Por lo tanto, la edición de genes basada en HDR puede usarse para reparar mutaciones causantes de enfermedades o para modificar secuencias en loci específicos para inducir patrones de expresión predecibles (Yin, Kauffman y Anderson, 2017).

No fue hasta el siglo XXI cuando la técnica se mejoró con el uso de endonucleasas sitio-específicas que permitían cortar el ADN en regiones concretas, como las nucleasas de actividad similar a activadores de la transcripción (TALENs) o nucleasas dedos de Zinc (ZFNs) (Urnov *et al.*, 2010) y años más tarde también gracias a las agrupaciones de nucleasas asociadas a repeticiones cortas palindrómicas regularmente interespaciadas (CRISPR-Cas).

2.1 CRISPR

Se comenzó a hablar de estas regiones genómicas en 1987 cuando Nakata descubrió repeticiones de 29 pares de bases aguas abajo del locus del gen *iap* en *Escherichia coli*. Años más tarde, Jansen y Mojica detectaron que estas repeticiones aparecían en más del 40% de las especies bacterianas y consensuaron el nombre de CRISPR (Jansen et al. 2002). El origen y función de estos sistemas seguía sin conocerse y no fue hasta 2005 cuando diversos estudios (Mojica *et al.*, 2005)(Pourcel, Salvignol y Vergnaud, 2005)(Bolotin *et al.*, 2005) observaron que las secuencias espaciadoras eran homólogas a ADN presente en virus y plásmidos, siendo las víricas las mejor representadas y con una mayor homología, lo cual se pensó que era debido a su mayor facilidad para invadir la célula.

Con todo esto se enunció la hipótesis de que el sistema CRISPR actúa como defensa adaptativa frente a material genético exógeno debido a que los microorganismos que presentaban las repeticiones en su genoma eran capaces de defenderse frente a la invasión de los virus de los que obtuvieron las secuencias (Mojica et al. 2005). Estas secuencias conocidas actualmente como protoespaciadores aparecen flanqueadas por repeticiones palindrómicas cortas, y adyacentes a este conjunto aparecen unas secuencias conservadas que actúan como

líder denominadas PAM (Protospacer Adjacent Motif) que tienen un papel importante en el funcionamiento de los sistemas CRISPR-Cas (Bolotin et al. 2005).

En el mecanismo de acción participan dos ARN distintos, el ARN de CRISPR (crRNA) que contiene la secuencia variable objetivo y el ARN trans-activado (tracrRNA) que proporciona una estructura de tallo-bucle. Estos ARN en conjunto activan y guían a la proteína Cas (CRISPR asociada) para unirse al ADN exógeno que es seguidamente escindido (Deltcheva *et al.*, 2011). Un subgrupo de los sistemas CRISPR, el tipo II, utiliza una única proteína Cas para realizar el corte en el ADN objetivo lo que ha convertido a este tipo en el más interesante para ser usado como una herramienta de edición genética. Además, la combinación artificial de los crRNAs con los tracrRNAs en un único ARN guía individual (sgRNA) ha permitido simplificar el sistema y lo convierte en un procedimiento más barato y rápido en comparación que los métodos anteriores de edición genética sitio-específicos como son las TALENs o ZFNs. (Loesch, Desbois-Mouthon y Colnot, 2019).

La defensa CRISPR-Cas comprende un proceso de múltiples etapas mediante el cual fragmentos de ácidos nucleicos extraños se reconocen como no propios y se incorporan en el genoma del huésped entre repeticiones cortas de ADN (Hsu, Lander y Zhang, 2014). Posteriormente, estos fragmentos junto con las proteínas Cas del huésped, se utilizan como sistema inmune de vigilancia y adaptación mediante el cual los ácidos nucleicos extraños entrantes son reconocidos y destruidos o silenciados (Bhaya, Davison y Barrangou, 2011).

El proceso de defensa de CRISPR-Cas se puede separar en tres etapas. En la primera etapa, denominada adaptación (Marraffini y Sontheimer, 2010), se produce la adquisición de los espaciadores e implica el reconocimiento y posterior integración del ADN extraño entre dos unidades de repetición adyacentes dentro del locus CRISPR, y se eligió el término protoespaciador para diferenciar que esas secuencias no corresponden al genoma del huésped. Los protoespaciadores parecen estar integrados principalmente en un extremo del locus CRISPR, llamado extremo líder (Mojica *et al.*, 2009). Además, es frecuente la aparición de los PAM, requeridos para la adquisición del fragmento de ADN. Esta primera fase requiere también de dos nucleasas, Cas1 y Cas2, las cuales están universalmente presentes en los genomas de los microorganismos que tienen un sistema funcional CRISPR-Cas (Deveau, Garneau y Moineau, 2010).

En la segunda etapa, llamada etapa de expresión, una transcripción primaria o ARN preCRISPR (pre-ARNr) se transcribe desde el locus CRISPR por la ARN polimerasa. A continuación, las endorribonucleasas específicas escinden los pre-crRNA en pequeños crRNA.

Dependiendo de su función, estos pequeños ARN también se han denominado de silenciamiento procariótico (psiRNA) o ARN guía (Brouns *et al.*, 2013).

En la tercera y última etapa, la de interferencia, los crRNA, dentro de un complejo multiproteico, pueden reconocer secuencias específicas de ADN exógeno con los que tienen una complementariedad perfecta o casi perfecta. Esto inicia la formación del complejo crARN-ADN exógeno, provocando la degradación de la diana. Por otro lado, si hay desajustes entre el protoespaciador y el ADN objetivo o si hay mutaciones en la PAM, no se inicia la degradación de la diana. En este caso, el huésped no es inmune al ataque del virus. Esto lleva a la lisis del hospedador, y el virus liberado puede atacar a otras células hospedadoras susceptibles (Bhaya, Davison y Barrangou, 2011). Para operar como un sistema de defensa, las tres fases deben ser funcionales, pero es importante tener en cuenta que cada uno de estos procesos puede funcionar de manera independiente, tanto mecánica como temporalmente (Garneau *et al.*, 2010).

2.2 Proteínas asociadas a CRISPR o Cas

Los genes Cas son responsables de codificar proteínas funcionales que actúan como complejos efectores encargados de mediar y realizar los cortes en la doble hélice del ADN. Los sistemas CRISPR-Cas se dividen en dos clases que a su vez se dividen en varios Tipos y subtipos. La clase 1 contiene los Tipos I, III y IV y se encuentra en bacterias y arqueas, mientras que la clase 2, en la que aparecen los Tipos II, V y VI se detecta sólo en bacterias (Chylinski *et al.*, 2014). La estructura de las proteínas funcionales es más sencilla en la clase 2 ya que la actividad nucleasa se lleva a cabo por proteínas “simples” y grandes, en el Tipo II participa Cas9 (Figura 1) y en el Tipo V lo hace Cpf1, mientras que en la Clase 1 se utilizan varias proteínas que están formadas por multitud de subunidades formando el complejo CASCADE en el Tipo I y el complejo Cmr o Csm RAMP para el Tipo III (Karimian *et al.*, 2019).

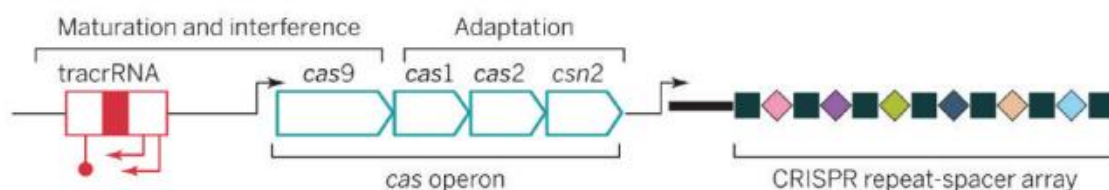


Figura 1. Estructura del locus CRISPR-Cas9 y sus componentes.

2.3 Cas9

No fue hasta 2013 cuando la proteína Cas del tipo II de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) fue utilizada por primera vez para cortar ADN en células de mamífero, estableciendo las bases para el uso de CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genética (Jinek *et al.*, 2012).

Antes de hidrolizar el ADN, Cas9 sufre un cambio conformacional por la unión del sgRNA y es dirigido a la zona donde actuará. La especificidad de esta unión está determinada por una secuencia de 20 nucleótidos precediendo los tres nucleótidos de PAM (Deltcheva *et al.*, 2011). Después de desenrollar el ADN, la endonucleasa se une a la estructura formada por PAM y el híbrido ADN-sgRNA y es entonces cuando dos dominios nucleasa introducen la DSB en el ADN objetivo.

A continuación, la célula responde reparando el error con uno de los procesos mencionados anterior anteriormente como NHEJ o HDR (Figura 2). En este paso pueden ocurrir mutaciones debidas a fallos en la reparación de la DSB, que pueden provocar inserciones, deleciones y cambios de bases (Schaefer *et al.*, 2017).

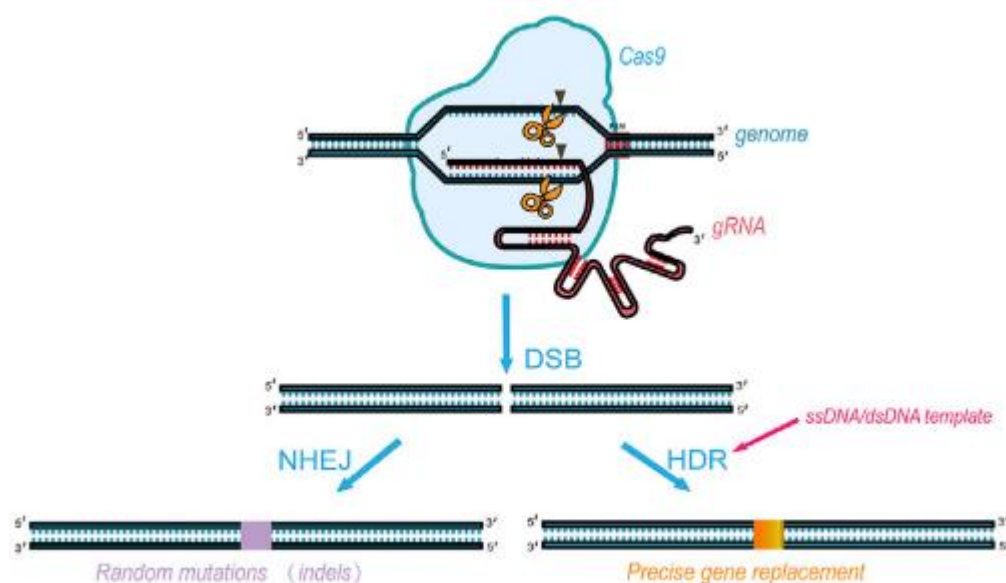


Figura 2. La nucleasa Cas9 escinde el ADN de doble cadena para introducir roturas de doble cadena (DSB) que luego son reparadas por NHEJ o HDR. Las vías de reparación de NHEJ propensas a errores siempre introducen inserciones o deleciones aleatorias (indels) (izquierda), pero con el uso de un donante de ADN exógeno, la vía HDR puede introducir inserciones precisas (derecha).

El poder de la actividad nucleasa está determinada por la eficiencia de unión de Cas9, por lo que las modificaciones sistemáticas de la estructura de los sgRNA la han mejorado, permitiendo una mayor eficiencia de Cas9 contra el ADN objetivo (Brooks y Gaj, 2018). Además de Cas9 existen otras nucleasas asociadas a CRISPR de tipo II, que utilizan sitios alternativos de PAM y además otros tipos de proteínas han sido desarrolladas, por ejemplo Cas13a/b, como herramientas de ingeniería genómica, pero no son tan comúnmente utilizadas (Smargon *et al.*, 2017).

Además de utilizar la proteína Cas9 silvestre, se han diseñado Cas9 sin nucleasa o nucleasa-deficiente (dCas9) que pueden ser fusionadas a dominios efectores otorgándoles la capacidad de ejecutar modificaciones específicas en zonas puntuales del ADN, estas modificaciones consisten principalmente en la regulación de la transcripción, del epigenoma, cambios de nucleótidos específicos o para el cribado de células (Zhan *et al.*, 2018).

2.3.1 Regulación de la transcripción

Uno de los primeros usos de los sistemas CRISPR-Cas9 modificados fue el de regular la transcripción, se desarrolló un sistema CRISPR de interferencia (CRISPRi) y un sistema CRISPR de activación (CRISPRa) que aprovechan la fusión de reguladores para reprimir o inducir la transcripción de genes cuando dCas9 es dirigido al lugar del inicio de la transcripción de un gen concreto (Singh, Braddick y Dhar, 2017). En la mayoría de los casos, los sistemas de acción de CRISPRi recaen en la fusión de dCas9 con un dominio represor KRAB para regular la transcripción del gen aguas abajo. Por el contrario, los CRISPRa no usan un solo mecanismo para aumentar la expresión génica si no que cuentan con diversas estrategias. La primera de ella utiliza un activador VP64 (una secuencia de proteína viral de 16 aminoácidos que se utiliza para la activación transcripcional) fusionado a dCas9, esta estrategia fue mejorada con la fusión de VP64 con otros dos activadores de la transcripción como son p65 y Rta formando el complejo VP64-p65-Rta (técnica llamada VPR) o con el reclutamiento de múltiples VP64 lo que requiere añadir una cola larga al epítipo de dCas9 (técnica llamada SunTag). También se ha modificado la estructura del sgRNA para incluir aptámeros y generar sitios de unión adicionales para dominios de activación (técnica llamada SAM). Actualmente se sigue investigando cual de estas técnicas para aumentar la transcripción es más efectiva (Zhan *et al.*, 2018). Otro modo en el que CRISPR-Cas9 puede ser utilizado como activador de la transcripción es mediante la fusión de dCas9 con la proteína p300, una histona acetiltransferasa, formando el complejo dCas9-p300, de tal modo

que se obtiene una proteína p300 programable que permite descondensar zonas específicas de la cromatina y acceder así regiones genómicas concretas para hacer posible su transcripción. Este método muestra mejor resultado que los anteriormente comentados cuando las secuencias objetivo están en las regiones regulares distales de los genes (IB *et al.*, 2015).

2.3.2 Modificaciones epigenéticas

Los sistemas CRISPR-Cas9 también son utilizados para investigar el epigenoma gracias a la fusión de dCas9 con proteínas que permiten modificaciones epigenéticas en regiones específicas. Las utilizadas para aumentar la metilación actúan sobre motivos CpG, lo que provoca una represión de la transcripción. Las más comúnmente usadas son dCas9-DNMT3A (Flitton *et al.*, 2019) junto con dCas9-DNMT3A-DNMT3L (Stepper *et al.*, 2017). También son utilizados los sistemas CRISPRi fusionados al represor KRAB ya que este complejo, además de ser un represor, puede actuar metilando regiones potenciadoras, lo que disminuye la transcripción de genes (Gilbert *et al.*, 2013). Por contra para disminuir la metilación del ADN se utiliza la proteína TET1 asociada a dCas9 (Flitton *et al.*, 2019).

2.3.3 Cambios específicos de nucleótidos

Últimamente se han desarrollado variantes de Cas9 capaces de inducir cambios de nucleótidos en bases específicas sin introducir DSBs. Estas nuevas técnicas dependen de nickasas acopladas a una citidina desaminasa para realizar la transición de C a T o de G a A. Por ejemplo, en un experimento reciente Komor *et al.* diseñaron un editor de bases fusionando Cas9-nickasa (Cas9D10A) a la proteína APOBEC1 de rata que codifica una enzima desaminasa de citidina y también a un inhibidor de la relación por escisión de bases (BER). Este sistema, denominado BE3, fue utilizado para corregir la zona Y163C del gen TP53, donde se producen mutaciones con alta frecuencia en el cáncer de mama, y se comprobó que tenía una gran eficiencia y una tasa de deleciones o inserciones muy baja (Komor *et al.*, 2016a). Un sistema alternativo para editar bases, utiliza una deaminasa de citosina inducida por activación para la desaminación (Nishida *et al.*, 2016). Aunque algunas construcciones muestran un rendimiento en la edición de bases, comparable al sistema BE3, su principal aplicación es introducir un conjunto diverso de mutaciones puntuales en los loci seleccionados, incluyendo el cambio a uno de los otros tres nucleótidos posibles. Por lo tanto, estos sistemas se pueden usar para generar una gran variedad local de nucleótidos en una región determinada, lo que se utiliza para estudiar los efectos fenotípicos al aplicar cambios concretos en determinados genes (Ma *et al.*, 2016).

2.3.4 Detección de mutagénesis

El cribado por CRISPR-Cas9 es una herramienta poderosa para descubrir nuevos puntos donde se podría actuar en el tratamiento de determinadas enfermedades lo que permitiría el desarrollo de fármacos nuevos. Esta herramienta permite diferenciar células de una población en función de su diversidad de genes inactivados, pero son necesarios cantidad de procesos bioinformáticos y experimentales (Ahmad y Amiji, 2018). En primer lugar, los sgRNAs más eficientes para cada gen objetivo son seleccionados y creados. En la mayoría de programas de diseño de sgRNAs, los algoritmos que prevén la eficiencia ya están integrados (Raghavendra y Pullaiah, 2018; Meier *et al.*, 2017). La librería de sgRNAs es sintetizada como un conjunto de oligonucleótidos e introducidos en plásmidos lentivirales para generar partículas virales que infectarán células que expresan Cas9 solo cuando hay niveles bajos de infección, lo que permite que teóricamente cada célula solo porte un cassette de sgRNA y un gen inactivado. Seguidamente el conjunto de células se cultiva durante un periodo de tiempo o se le somete a alguna perturbación tras la que son recolectadas y su ADN es extraído. Con la amplificación y secuenciación los sgRNAs integrados en los cassettes se puede calcular la cantidad de células portadores de un gen inactivado concreto. Gracias a esto es posible monitorizar los efectos fenotípicos de la inactivación de un gen sobre una población celular. Esta herramienta para el cribado con CRISPR podría modificarse utilizando otras variantes de Cas9 para por ejemplo realizar cribados de ganancia de función o añadiendo pequeñas moléculas que causen perturbaciones para investigar interacciones fármaco-gen (Zhan *et al.*, 2018).

Si bien la mayoría de las técnicas de cribado CRISPR están diseñadas para identificar genes que muestran un fenotipo específico, los nuevos enfoques de cribado tienen como objetivo obtener una visión más global de los cambios biológicos asociados con la perturbación de un gen específico. Kuscu *et al.* demostraron recientemente como el sistema B3 puede ser adaptado para realizar cribados con CRISPR, ya que mientras que los cribados con la proteína Cas9 silvestre utilizan inserciones o deleciones para inhabilitar funcionalmente los genes, la herramienta CRISPR-STOP mediada por BE3, fija nucleótidos objetivo donde introduce codones de terminación. A pesar de que este sistema está limitado a un pequeño número de sitios potenciales de unión de los sgRNAs, ofrece una solución alternativa para evitar la formación de artefactos que suelen ocurrir tras varios DSBs al actuar sobre genes que aparecen amplificados (Kuscu *et al.*, 2017).

2.4 Métodos para introducir CRISPR/Cas9 in vivo

Para aplicar CRISPR-Cas9 in vivo, es necesario transportar Cas9 y el sgRNA al interior de las células diana. El método ideal será aquel que ofrezca una gran eficiencia de edición, que cause poca respuesta inmunogénica y que sea capaz de dirigir Cas9 y el sgRNA al órgano o tejido seleccionado (Cai *et al.*, 2016). Los primeros experimentos de edición genética con CRISPR-Cas9 utilizaron plásmidos de expresión con los dos componentes necesarios, pero se realizaron ex vivo (Dwivedi *et al.*, 2018). En organismos modelo como los ratones, este método también es adecuado para aplicaciones in vivo, ya que el plásmido puede suministrarse al tejido mediante inyección hidrodinámica (Xue *et al.*, 2014) o mediante electroporación (Zuckermann *et al.*, 2015). En ocasiones, la eficiencia de la edición es baja debido a que Cas9 cuenta con baja actividad y puede ser pobremente controlada, por lo que para mejorar su uso in vivo se han desarrollado métodos de introducción más eficientes, tanto virales como no virales.

Los virus adeno-asociados (AAV) han surgido como una herramienta potente debido a que no son integrativos, poseen una gran eficiencia de transducción y son compatibles serológicamente con una gran proporción de la población humana (Bak y Porteus, 2017). Además, esta familia de virus cuenta con una gran diversidad de serotipos con distintos tropismos tisulares, permitiendo seleccionar como objetivos diferentes órganos y tejidos, aunque debido al limitado espacio de carga con el que cuentan estos vectores a veces es necesario introducir Cas9 y el sgRNA en vectores diferentes. Para que lleguen a su objetivo, los AAVs pueden ser administrados sistemática o directamente en el tejido diana. Wu *et al.* demostraron que inyecciones subretinales de estas partículas pueden modificar eficazmente el gen NRL en los receptores retinales postmitóticos (Yu *et al.*, 2017). En un procedimiento similar, también se administraron inyecciones locales en el núcleo estriado de ratones para modificar el gen HTT (Yang *et al.*, 2017). En cuanto a la vía sistémica, es importante seleccionar el serotipo correcto de AAV para que la edición genómica se produzca en el tejido deseado y además colocar Cas9 tras promotores específicos de ese tejido para evitar que se accione en otros. Este procedimiento fue utilizado con éxito para editar el gen de la ornitina transcarbamilasa en hígado de roedor y el gen de la distrofina en tejido muscular (Yang *et al.*, 2016; Tabebordbar *et al.*, 2015) y tras la aplicación sistemática la frecuencia de edición estuvo entre el 10% y el 70% lo que es suficiente para poder observar mejoras fenotípicas en los modelos de roedores y, por tanto, permite tratar estas enfermedades hereditarias. A pesar de que tanto la expresión de Cas9 y la presencia del AAV causa una respuesta humoral, esta no produce daño celular aparente (Yang *et al.*, 2016).

Una alternativa al uso de virus para el transporte de CRISPR-Cas9 son las nanopartículas lipídicas, cuya mayor ventaja es que pueden ser creadas a escala industrial y por tanto es posible alcanzar unas dosis de producción más similares al resto de fármacos comúnmente usados (Finn *et al.*, 2018). Las nanopartículas lipídicas ya han sido utilizadas para transporta siRNA y mRNA en pruebas clínicas (Liu y Shui, 2016; Li y Snider, 2018) pero no fue hasta hace poco que una serie de estudios demostraron que el ARN de Cas9 y los sgRNA pueden ser introducidos en estas nanopartículas y transportadas con alta eficiencia (Pardi *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2017; Finn *et al.*, 2018). Además, las nanopartículas modificadas pueden cargarse adicionalmente con un fragmento de un gen que actúe como donante y, por lo tanto, también permiten la HDR. En un estudio se realizó una corrección del gen de la distrofina mediante de la inyección intramuscular de nanopartículas lipídicas que contaban con un gen modelo de un donante sano, pero la eficiencia de edición fue bastante baja (5,3%) (Lee *et al.*, 2017).

Actualmente se están realizando grandes esfuerzos para establecer y mejorar CRISPR-Cas9 como una herramienta de reparación genética que pueda ofrecer grandes avances en la terapia génica, pero el éxito de esta herramienta dependerá en gran medida de las mejoras que se realicen en la administración específica de Cas9 junto con el sgRNA en un tejido concreto sin actuar en otras líneas celulares y de las experiencias obtenidas de experimentos actuales y futuros (O'Brien *et al.*, 2019).

3. Metodología

En esta revisión bibliográfica sobre la terapia génica mediante sistemas CRISPR-Cas, la búsqueda bibliográfica se ha fundamentado en la búsqueda electrónica a través de las bases “Scopus”, “Pubmed” y “ScienceDirect”. También se han utilizado bases de datos públicas sobre ensayos clínicos que utilicen los sistemas CRISPR-Cas, en especial las bases: “ClinicalTrials”, “Smartpatients” y “JMACCT”. Para ello se realizó una búsqueda del término “CRISPR” en estas bases a día 10 de mayo de 2019 obteniéndose 26 ensayos, los cuales fueron filtrados con los siguientes criterios:

- Ensayos que no utilizan CRISPR-Cas.
- Ensayos suspendidos.
- Ensayos que llevan más de un año sin actualizar su estado.

Tan solo 12 ensayos cumplían todos los criterios. La figura 3 resume el proceso seguido para la selección de los ensayos.

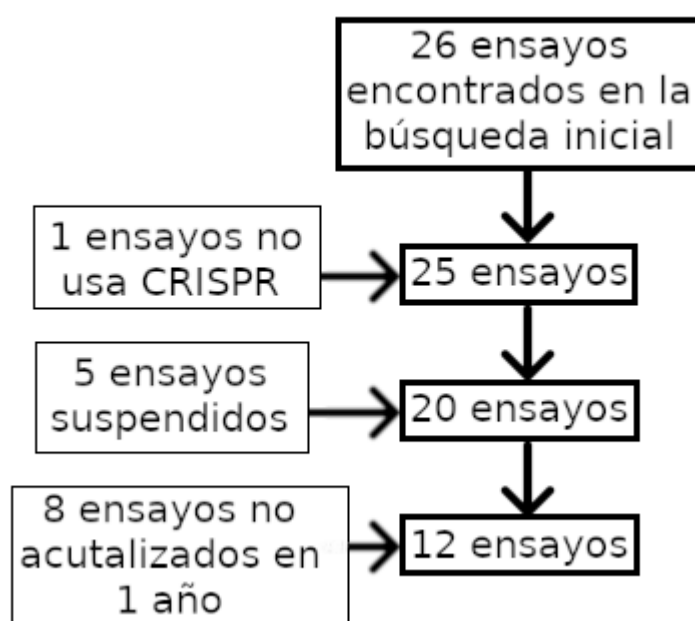


Figura 3. Selección de ensayos para la investigación.

Se confeccionó un cronograma estimativo con la distribución de todas las tareas a realizar, junto con el tiempo en semanas para controlar y organizar el trabajo por fases. A continuación, se muestra el diagrama de Gantt:

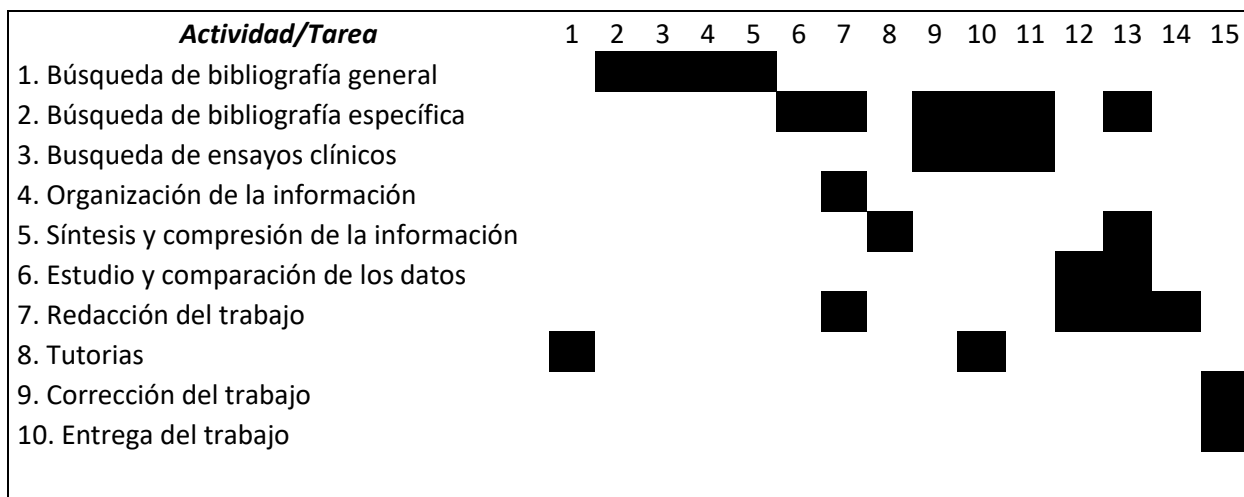


Figura 4. Diagrama de Gantt

4. Análisis e integración de la información

4.1 Primeras pruebas con CRISPR-Cas9 en humanos.

La capacidad para editar genes, no solo en modelos de cultivos celulares u organismos modelo, sino también en humanos, se llevan discutiendo desde mucho antes de que se hayan desarrollado las tecnologías necesarias para poder realizarlo. Esta terapia génica somática se puede definir como la introducción de nuevo material genético en células somáticas o la modificación del ya existente, con el objetivo de expresar productos genéticos terapéuticos que sirvan en el tratamiento de enfermedades concretas (Hong, 2018). Los ensayos de terapia génica se llevan realizando desde los años 80 sin mucho éxito debido a problemas con el silenciamiento de los productos genéticos, la respuesta inmune del huésped, los vectores virales y la mutagénesis espontánea (Musunuru, 2017). Aunque la mayoría de estos problemas no se han resuelto fundamentalmente, en los últimos años se han publicado resultados prometedores de la terapia génica somática (Hirsch *et al.*, 2017; Perry *et al.*, 2017). Las nuevas tecnologías de edición de genes pueden solventar algunos de los problemas actuales y permitir la modificación permanente de las células somáticas. Al igual que en estudios con animales, se estudian los enfoques *in vivo* y *ex vivo*. En comparación con la edición del genoma *ex vivo*, la edición del genoma *in vivo* está aún menos implementada en los ensayos clínicos.

4.2 Ensayos clínicos.

En octubre de 2016, comenzó el primer ensayo clínico que utilizó CRISPR en humanos, en la Universidad de Sichuan (ClinicalTrials.gov: NCT02793856) (Yi y Li, 2016). Hasta el momento, 25 ensayos clínicos que usan CRISPR han sido registrados en bases oficiales de ensayos clínicos. Estos ensayos se centran, principalmente, en el tratamiento de diversas neoplasias malignas y en la infección por VIH, aunque 16 de estos ensayos se encuentran cancelados o sin actualizarse desde el año 2017.

4.2.1 Ensayos en tejidos sólidos.

Al trabajar sobre tejidos es necesario hacer llegar los componentes del sistema CRISPR-Cas hasta la zona donde se busca que actúen, sin que alcancen otras zonas donde podrían causar efectos adversos. La gran mayoría de pruebas con CRISPR-Cas sobre tejido sólidos se han realizado en roedores donde es posible la administración directa vía inyección pero en humanos esto solo es posible en determinados tejidos (Chow y Chen, 2018). Además existe un problema de escalado de las dosis ya que las que se utilizan en roedores no pueden ser extrapoladas a

humanos y es muy difícil obtener los permisos para realizar las comprobaciones de dosis en humanos debido a problemas tanto éticos como de salud (Brokowski y Adli, 2019). Actualmente siguen desarrollándose nuevos métodos para lograr esto a la vez que se mejoran los ya existentes.

Un único ensayo está realizando pruebas sobre tejidos sólidos en humanos (ClinicalTrials.gov: NCT03872479). Este estudio que se encuentra en la fase 1-2, busca evaluar la tolerabilidad, la eficacia y la seguridad de dosis crecientes de AGN-151587, un fármaco para la edición genética basado en CRISPR-Cas9. El fármaco se administrará mediante una inyección subretinal a pacientes con amaurosis congénita de Leber causada por una mutación (c.2991+1655A>G), homocigótica o heterocigótica, en el intrón 26 del gen CEP290. Corrigiendo esta mutación directamente en la zona afectada prevén una mejora en la visión de los pacientes sin que se produzca una toxicidad excesiva que cause daño a la retina. Este estudio es el único en tejidos sólidos y es posible gracias a que es un tejido fácilmente accesible. El fármaco está protegido bajo patente por lo que no es posible acceder a información publicada sobre como utilizan el sistema CRISPR-Cas9 para corregir la mutación.

4.2.2 Ensayos en tejidos no sólidos.

Estos ensayos se centran en modificar principalmente linfocitos T o células madre hematopoyéticas. Esto facilita en gran medida las pruebas debido a que al encontrarse en un medio líquido es posible extraer las células y modificarlas fuera del cuerpo del paciente para, más tarde, volver a introducirlas ya alteradas (You *et al.*, 2019).

En el China PLA General Hospital, bajo la dirección de Weidong Han, se están realizando pruebas (ClinicalTrials.gov: NCT03545815 y NCT03747965) para tratar con CRISPR-Cas9 los tumores sólidos que expresan mesotelina, un marcador bioquímico que aparece en las células cancerosas mesoteliales (Forest *et al.*, 2018). Utilizan CRISPR-Cas9 para inactivar los genes PD-1 y TCR de las células T con receptor de antígeno quimérico (células CAR-T), lo cual debería provocar un mayor efecto de estas células sobre los tumores al evitar que se inactiven (Mizuno *et al.*, 2019). Esto es debido a que PD-1, un inhibidor del punto de control presente en la superficie de las células cancerosas puede unirse al receptor PD-1 en las células T activadas e inhibir el efecto de la eliminación de los cánceres mediada por células T. Por lo tanto, la eliminación genética de PD-1 puede ser un método útil para mejorar la eficacia de la inmunoterapia basada en células (Topalian, Drake y Pardoll, 2015). El segundo estudio combinará esta técnica junto con un tratamiento previo con paclitaxel, un fármaco

quimioterapéutico que inhibe la formación del huso mitótico, y ciclofosfamideto, un inmunosupresor (Lu *et al.*, 2011). Además, al estar en una fase inicial, también buscan conocer la viabilidad de las células modificadas al ser reinyectadas en el cuerpo y comprobar que son seguras para el paciente. Comenzarán con dosis bajas que irán aumentando con el estándar 3+3, empezando en el nivel de dosis I de este estándar. Sin embargo, no se especifica como se realizará la modificación celular con CRISPR-Cas9.

Los anteriores estudios no son los únicos que utilizan CRISPR-Cas9 para inactivar los genes de PD-1 y TCR como terapia contra el cáncer, en Estados Unidos, la universidad de Pensilvania está realizando un estudio muy similar (ClinicalTrials.gov: NCT03399448) pero dirigiendo a los linfocitos modificados contra la diana NY-ESO-1 propia de los cánceres de esófago (Thomas *et al.*, 2018). En este ensayo las células CAR-T se transducen con vectores lentivirales para que sean capaces de reconocer NY-ESO-1 y se utiliza la electroporación para introducir Cas9 junto con los sgRNA para inactivar los genes de TCR α , TCR β y PD-1.

En otro estudio, el hospital infantil de Texas junto con el Colegio de Medicina de Baylor (Huston, Texas) buscan tratar la leucemia/linfoma de células T (LLCT) (ClinicalTrials.gov: NCT03690011). Basándose en estudios anteriores de los mismos investigadores (Rezvani *et al.*, 2017)(Carrum *et al.*, 2019) tienen como objetivo extraer linfocitos T de los pacientes con leucemia para cultivarlos y reintroducirlos cuando sean suficientes para ser efectivos sobre la leucemia, pero además se les añadirá un receptor anti-CD7 en su membrana externa para que sean capaces de reconocer las células T cancerosas (Rezvani *et al.*, 2017) y un receptor CD28 que actúa como potenciador de los linfocitos T (Arnold *et al.*, 2014). En el experimento utilizan CRISPR-Cas9 para eliminar los genes de CD7 de los linfocitos extraídos y así evitar que se destruyan unos a otros. Estas células modificadas son un producto aún no aprobados por la Administración de drogas y alimentos de EE. UU. (FDA) y se administrarán en tres dosis diferentes junto a agentes inmunosupresores (ciclofosfamida) y una sustancia quimioterapéutica (fludarabina). Al tratarse de un estudio en la fase I, su principal objetivo es conocer la dosis máxima sin que se produzca toxicidad.

Una cuarta institución también trabaja con células CAR-T, en este caso es la universidad de Sichuan, que como ya se mencionó anteriormente fue la primera en realizar pruebas con CRISPR-Cas en humanos. La universidad en colaboración con la compañía Chengdu MedGenCell ha desarrollado células CAR-T con el gen de PD-1 inactivo como terapia contra el cáncer y en 2016 iniciaron una serie de ensayos de escalado de dosis para comprobar si realizan su efecto sin resultar peligrosas para el paciente. Tres de estos ensayos están a cargo de la Universidad de Pekín mientras que solo uno la Universidad de Sichuan. Aunque no lo indican directamente,

observando estudios anteriores de los mismos investigadores junto con resultados ya publicados (Yi y Li, 2016; Su, Liu y Zou, 2015; Koshkin y Rini, 2016), es probable que la inactivación se realizará introduciendo en plásmidos los sgRNA junto con Cas9 por electroporación. Actualmente cuentan con cuatro ensayos los cuales se encuentran en pausa debido a la falta de financiación. Uno de ellos utiliza las células modificadas para tratar el cáncer de pulmón metastático de células no pequeñas (ClinicalTrials.gov: NCT02793856), otro para el cáncer de vejiga con invasión muscular (ClinicalTrials.gov: NCT02863913), un tercero para el carcinoma renal metastático (ClinicalTrials.gov: NCT02867332) y un por último para el cáncer de próstata resistente a la castración (ClinicalTrials.gov: NCT02867345).

Dejando de lado los linfocitos T, las células troncales hematopoyéticas (HSCs) son también ampliamente usadas en estudios para el tratamiento de diversas enfermedades. La farmacéutica Vertex está probando en adultos jóvenes su fármaco CTX001 desarrollado por CRISPR therapeutics para tratar la β -talasemia dependiente de transfusión (ClinicalTrials.gov: NCT03655678). Otro ensayo que está realizando Vertex (ClinicalTrials.gov: NCT03745287) también utiliza un procedimiento bautizado como CTX001 para tratar la anemia falciforme. Este tratamiento consiste en modificar las células HSCs CD34+ una vez extraídas. Se introduce CRISPR-Cas9 en las células por electroporación y se utiliza para inhibir la expresión de BCL11A, un gen que produce un represor de la hemoglobina fetal (HbF). Este cambio provoca una mayor producción de HbF, con el objetivo de que esas células modificadas se diferencien como glóbulos rojos que sobreexpresen HbF (El-Beshlawy y El-Ghamrawy, 2019)(You *et al.*, 2019). La HbF es un tipo de hemoglobina que está presente naturalmente en el nacimiento, y que posteriormente es reemplazada por la forma adulta de la hemoglobina. La elevación de HbF por CTX001 tiene el potencial de disminuir los requisitos de transfusión para los pacientes con β -talasemia y de reducir las crisis falciformes que producen dolor y debilidad a los pacientes con anemia falciforme (Musallam *et al.*, 2012). Al tratarse de estudio Sen fase I-II, los objetivos principales son conocer las dosis adecuadas para ser suministrado, comprobar si la administración produce cambios en el hemograma y en la calidad de vida y, secundariamente, si estos cambios vienen acompañados de modificaciones en la proporción de alelos de las células sanguíneas con respecto al inicio.

Siguiendo con el uso de HSCs, la empresa Allife Medical Science and Technology también se encuentra realizando la fase I de un tratamiento para la β -talasemia dependiente de transfusión (ClinicalTrials.gov: NCT03728322), pero en este ensayo no sustituyen una hemoglobina por otra si no que tratan de corregir el gen HbB, cuya mutación produce la enfermedad (Lattanzi *et al.*,

2019). Este ensayo no ofrece información ni del modo en que CRISPR-Cas9 será utilizado para reparar el gen ni de como los componentes del sistema serán introducidos en las células.

Entidad (ensayo)	Células modificadas	Enfermedad	Uso de CRISPR-Cas9	Método de introducción
China PLA General Hospital (NCT03545815)	Células CAR-T	Mesotelioma	Inactivar genes	Desconocido
China PLA General Hospital (NCT03747965)	Células CAR-T	Mesotelioma	Inactivar genes	Desconocido
Universidad de Pensilvania (NCT03399448)	Células CAR-T	Cáncer de esófago	Inactivar genes	Lentivirus (CRISPR-Cas9) Electroporación (sgRNA)
Hospital infantil de Texas junto con el Colegio de Medicina de Baylor (NCT03690011)	Células CAR-T	Leucemia de las células T o linfomas	Eliminar gen	Desconocido
Universidad de Sichuan junto con Chengdu MedGenCell Co. (NCT02793856)	Células CAR-T	Cáncer de pulmón metastático de células no pequeñas	Inactivar gen	Electroporación
Universidad de Pekín (NCT02863913)	Células CAR-T	Cáncer de vejiga con invasión muscular	Inactivar gen	Electroporación
Universidad de Pekín (NCT02867332)	Células CAR-T	Carcinoma renal metastático	Inactivar gen	Electroporación
Universidad de Pekín (NCT02867345)	Células CAR-T	Cáncer de próstata resistente a la castración	Inactivar gen	Electroporación
Vertex (NCT03655678)	HSCs CD34+	β -talasemia dependiente de transfusión	Inactivar gen	Electroporación
Vertex (NCT03745287)	HSCs CD34+	Anemia falciforme	Inactivar gen	Electroporación
Allife Medical Science and Technology Co. (NCT03728322)	HSCc	β -talasemia dependiente de transfusión	Corregir gen	Desconocido

Tabla 1. Resumen de los ensayos clínicos que en la actualidad utilizan CRIPR-Cas9 sobre tejidos no sólidos de humanos.

4.3 Simulación práctica.

En este apartado se plantea diseñar mediante programas informáticos un método para tratar la enfermedad de Stargardt producida por mutaciones en el gen *ABCA4*, una enfermedad monogénica recesiva de la cual no se han publicado artículos ni ensayos médicos en las que utilicen CRISPR-Cas9 para tratarla en humanos. Se ha elegido esta enfermedad por estar causada por la mutación de un solo gen y por afectar a una zona de fácil acceso para la administración de fármacos, lo que la convierte en una buena candidata para ser tratada con CRISPR-Cas. En esta simulación se diseñarán los sgRNA correspondientes y se utilizará Cas9 para la reparación del gen *ABCA4*. Se corregirá la variante NM_000350.2(*ABCA4*):c.1669T>C(p.Tyr557His), una mutación contrasentido no estudiada anteriormente que provoca el cambio de una tirosina a una histidina, se elige esta mutación por ser contrasentido y por no haber sido estudiada. Los afectados por mutaciones contrasentido en el gen *ABCA4*, producen una acumulación en la retina de lipofuscina, un material de desecho del metabolismo (Avela *et al.*, 2018), en esta simulación se asume que por tanto esta mutación también provocará el fenotipo de la enfermedad, pero aunque esto no fuera así no supondría ningún impedimento al tratarse de una simulación del uso de CRISPR-Cas que no será llevada a cabo experimentalmente. Este material no se elimina debido al mal funcionamiento de la proteína, lo que provoca la muerte de células retinales y por tanto daños en la retina que causan pérdida de visión, pero la cantidad de pérdida varía. Existen muchas formas diferentes del gen defectuoso y, como resultado, algunas personas tienen una enfermedad más grave que otras (Spiteri Cornish *et al.*, 2017).

La enfermedad de Stargardt conduce a la atrofia del epitelio pigmentario retinal y una vez que se establece la atrofia y se pierde, también comienza a perderse el epitelio coriocalar. Se intentó realizar trasplantes del epitelio pigmentario retinal pero a pesar de que ha demostrado retrasar la aparición de síntomas si se realiza en niños (Naycheva *et al.*, 2013), este procedimiento no es capaz de mejorar la función en pacientes adultos debido a que es poco probable que el tejido trasplantado sobreviva debido a la falta de nutrición si no hay coriocalar, por lo que no cura la enfermedad (Mehat *et al.*, 2018). El uso de CRISPR-Cas9 para reparar el gen se plantea como una posible solución a la enfermedad (Burnight *et al.*, 2017).

4.3.1 Diseño del sgRNA.

Para el diseño del sgRNA se utilizará la herramienta CrispRGold (Chu *et al.*, 2016) diseñada por el Centro de Medicina Molecular Max Delbrück de Alemania. Se planteó utilizar otras plataformas como CRISPCut (Dhanjal, Radhakrishnan y Sundar, 2018), E-CRISPR (Heigwer, Kerr y

Boutros, 2014) o CRISPRy (Blin *et al.*, 2016) pero se eligió CrispRGold debido a la facilidad para interpretar su interfaz y a que cuenta con grandes bases de datos, especialmente para genes humanos. Esta página proporciona sugerencias para los sitios de unión de los crRNA más apropiados dentro de la región deseada del genoma humano y diseña sgRNA para ellos. CrispRGold identifica secuencias diana complementarias al crRNA que terminan en un PAM 3' requerido para que Cas9 corte el ADN. La herramienta requiere que sea introducida, en formato FASTA, la secuencia de la región donde se encuentra la mutación que queremos reparar, la cual se puede obtener en la base de datos dbSNP (dbSNP, 2019). La búsqueda se realiza introduciendo el código rs, un código designado por la base de datos para la mutación NM_000350.2(ABCA4):c.1669T>C(p.Tyr557His), en el gen ABCA4. En este caso el código es obtenido en la base de datos ClinVar (ClinVar, 2019) mediante la búsqueda de mutaciones para este gen en su buscador y corresponde al rs113789195. Una vez obtenido el código ya es posible realizar la búsqueda en la base de datos dbSNP (Figura 5) y una vez realizada, descargar el archivo FASTA correspondiente a la región objetivo.

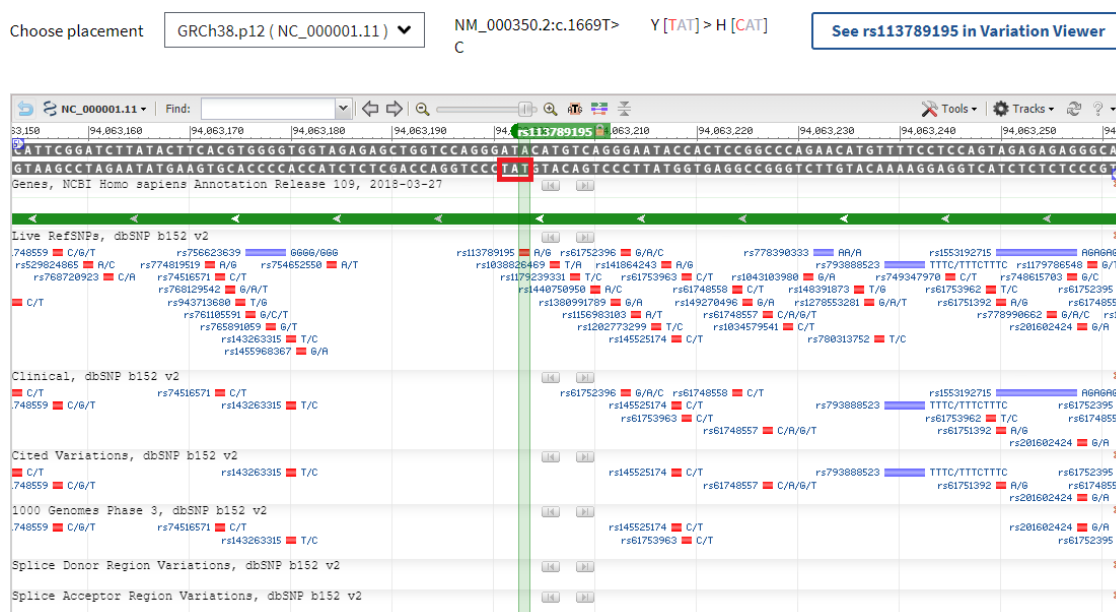


Figura 5. Posición de la mutación en el visor de variaciones de la base de datos dbSNP. En rojo aparece marcado el codón que presenta la mutación.

El primer paso para diseñar el sgRNA es seleccionar dentro de la página web de CrispRGold el apartado de Diseño y asignar como organismo a *Homo sapiens* junto con el genoma de referencia, en este caso se usará GRCh38 por ser el más actual. Se indica que la secuencia va a

ser introducida en formato FASTA y que nos muestre todos los sgRNA disponibles para la secuencia. El resto de los valores se dejan por defecto (Figura 6).

The image shows the CrispRGold web interface with the following settings:

- CrispRGold version:** CrispRGold 1.1 (Latest version)
- Target organism:** Human (Homo sapiens, hg38) - Latest version
- Design method:** By sequence (fasta format)
- Cloning vector (for ready-to-order oligos):** Standard vectors (pX330, lentiCRISPR v2, etc) (BbsI)
- Number of sgRNAs per gene/sequence:** All (slow for large gene sets)
- Number of top-risk off-target sites shown:** 15
- Sequences (fasta format):**

```
>gi|215598788|ref|NG_009073.1|:62897-63005 Homo sapiens ATP binding cassette subfamily A member 4 (ABCA4), RefSeqGene on chromosome 1|
CTCTACTGGAGGAAACATGTTCTGGGCCGGAGTGGTATTCCTGACATGTATCCCTGGACACAGCTCTCTACCAACCCACGCTGAAGTATAAGATCCGAATGGACATAGA
```

Figura 6. Interfaz de la herramienta de diseño CrispRGold donde se muestran los valores introducidos para diseñar los sgRNA.

El sgRNA elegido es el SEQ1_6, cuya secuencia es la siguiente: *CTGGTCCAGGGATACATGTC*. Este sgRNA no cuenta con los niveles de especificidad más altos pero estos son aceptables, según los criterios de los desarrolladores de la herramienta (Graf *et al.*, 2019), y es el único que su secuencia hibrida en la zona de la mutación lo que es necesario para realizar el cambio de nucleótido (Schatoff, Zafra y Dow, 2019), además de una secuencia PAM del tipo 5'-NGG-3' (en este caso AGG) lo que hace más interesante su uso. La página ofrece otros datos como la temperatura de fusión o la energía de unión del sgRNA que no se tendrán en cuenta al tratarse de una simulación.

Una vez obtenido el sgRNA es conveniente comprobar que no existan sitios off-target en el genoma, es decir, que no se una a regiones de secuencia similar sobre las que no debería actuar. Algunos de estos off-target pueden explicarse por la unión de Cas9 a secuencias PAM no canónicas (Tadić *et al.*, 2019). Las herramientas en línea para el diseño *in silico* de las moléculas de sgRNA pueden clasificarlas según su similitud de secuencia con otras no objetivo que se

encuentran en el genoma y pueden predecir posibles sitios off-target donde se unirá. Sin embargo, diversos experimentos in vivo e in vitro (Hsu, Lander y Zhang, 2014; Zheng *et al.*, 2017) han revelado que estas herramientas subestiman los posibles sitios de unión. A pesar de esto es conveniente su comprobación para la cual se utilizará la herramienta Cas-OFFinder (Bae, Park y Kim, 2014). Cas-OFFinder permite la búsqueda rápida de posibles sitios off-target en cualquier genoma secuenciado sin limitar la secuencia PAM o el número de bases que no coinciden. Una vez en la web de Cas-OFFinder, se copiará la secuencia del sgRNA sin la PAM y se elegirá como organismo objetivo al ser humano, además se especifica que es del tipo de PAM 5'-NGG-3' (Figura 7A), el resto de los parámetros no se han tenido en cuenta al tratarse de una simulación. Tras rellenar los datos se pulsa el botón de enviar y se procede a la búsqueda. Los resultados (Figura 7B) muestran que existe un sitio off-target para el sgRNA seleccionado. El siguiente paso fue buscar las coordenadas del sitio off-target en IGV (Robinson *et al.*, 2011) una herramienta de visualización de alto rendimiento para la exploración de grandes conjuntos de datos genómicos integrados, en la cual es posible observar que la posición indeseada donde podría actuar el sgRNA (Figura 7C). Esta zona corresponde a una región intrónica alejada de cualquier exón por lo que su modificación no debería conllevar ningún efecto negativo para los pacientes y por tanto la simulación puede seguir adelante.

CRISPR
RGEN Tools

About
Cas-OFFinder
Microhomology
Cas-Designer
Database
Cas-Analyzer
Digenome-Seq
Base Editing

PAM Type

CRISPR/Cas-derived RNA-guided Endonucleases (RGENs)

- SpCas9 from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NGG-3'
- SpCas9 from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NRG-3' (R = A or G)
- StCas9 from *Streptococcus thermophilus*: 5'-NNAGAAW-3' (W = A or T)
- NmCas9 from *Neisseria meningitidis*: 5'-NNNNGMTT-3' (M = A or C)
- SaCas9 from *Staphylococcus aureus*: 5'-NNGRRT-3' (R=A or G)
- CjCas9 from *Campylobacter jejuni*: 5'-NNNRYAC-3' (V = G or C or A, R = A or G, Y = C or T)
- CjCas9 from *Campylobacter jejuni*: 5'-NNNNRYAC-3' (R=A or G, Y= C or T)
- AsCpf1 from *Acidaminococcus* or LbCpf1 from *Lachnospiraceae*: 5'-TTTN-3'
- AsCpf1 from *Acidaminococcus* or LbCpf1 from *Lachnospiraceae*: 5'-TTTV-3' (V = G or C or A)
- SpCas9 from *Streptococcus pasteurianus*: 5'-NNGTGA-3'

Query Sequences

Query sequences (5' to 3'), one sequence per line.
Please write crRNA sequences **without PAM sequences** (e.g. without NGG for SpCas9).
The length of each query sequence should be between **15** and **25** nt, and **all be the same length!**

CTGGTCCAGGGATACATGTC

Please note that large number of bulge size will significantly increase the calculation time!
Mixed bases are allowed.
The count of query sequence must be less than 1000.

Mismatch Number (eq or less than) 0
DNA Bulge Size (eq or less than) 0
RNA Bulge Size (eq or less than) 0

Figura 7A. Página de inicio de la herramienta Cas-OFFinder donde se seleccionan los parámetros para la búsqueda de sitios off-target. La flecha roja indica donde se introduce la secuencia del sgRNA. La flecha azul indica el tipo de PAM seleccionado.

Summary

Target Sequence	Bulge Type	Bulge Size	Mismatch	Number of Found Targets
CTGGTCCAGGGATACATGTCNGG	X	0	0	1

Details

Bulge Type	Target	Chromosome	Position	Direction	Mismatches	Bulge Size
X	crRNA: CTGGTCCAGGGATACATGTCNGG DNA: CTGGTCCAGGGATACATGTCAAG	chr1	94063189	+	0	0

Figura 7B. Página donde se muestran los resultados de la búsqueda de sitios off-target para el sgRNA diseñado. Aparecen las coordenadas dentro del genoma de un sitio off-target.

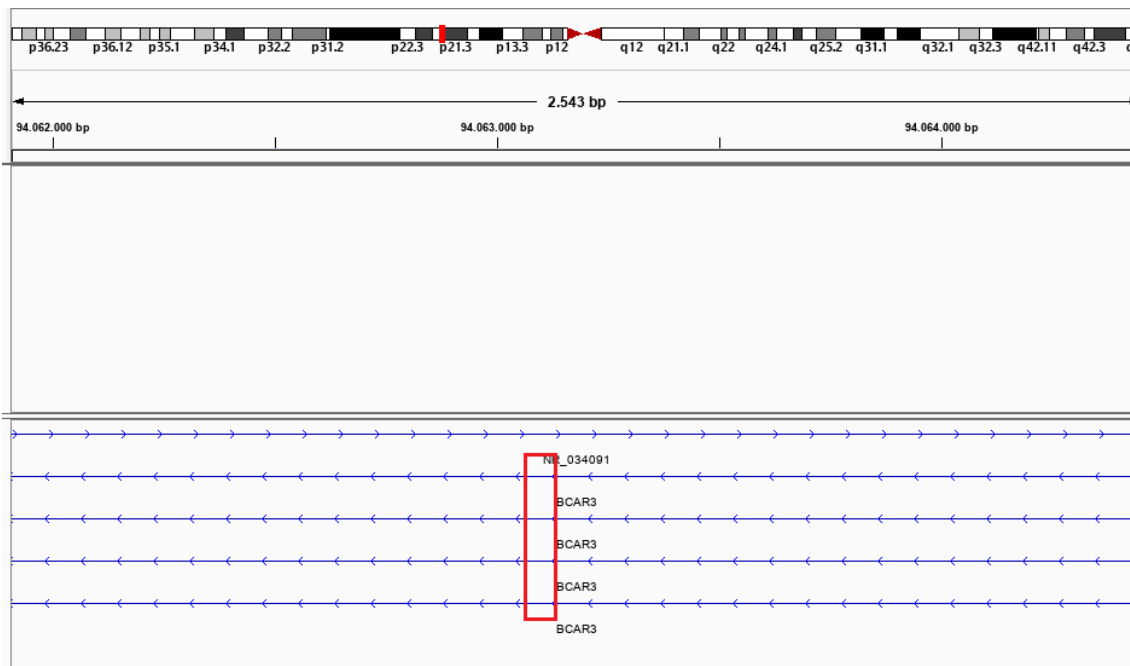


Figura 7C. Interfaz de la herramienta IGV. En rojo aparece marcada la zona donde aproximadamente podría actuar el sgRNA, puede observarse que no aparece ningún exón a mas de 1000pb en ambas direcciones.

4.3.2 Modificación del nucleótido mutado.

La mutación escogida para reparar, responsable de la enfermedad, es un cambio de una timina (T) a una citosina (C), por lo que para tratar la enfermedad con CRISPR-Cas9 es posible

utilizar Cas9 modificada para que actúe como un editor de bases. Los editores de base consisten en una nucleasa Cas9 parcialmente activa (Cas9D10A) unida a una enzima modificadora de ADN natural o sintética, de tal modo que no es necesario producir DSB (Schatoff, Zafra y Dow, 2019). Utilizando las enzimas existentes, únicamente es posible inducir cambios de C a T, de G a A, de A a G o de T a C, es decir, de purina a purina o de pirimidina a pirimidina, pero aún no hay sistemas descritos que catalicen directamente las transversiones de nucleótidos (Kim *et al.*, 2017). En esta simulación el cambio buscado es de C a T por lo que esto no supone un problema. Se utilizará el editor de bases descrito por Komor *et al.* (Komor *et al.*, 2016), formado por dCas9 fusionado a APOBEC (enzima editora de la apolipoproteína B mediante ARNm semejante al polipéptido catalítico) y UGI (inhibidor de la uraciloglicosidasa), además se añade un segundo UGI junto con una proteína GAM (proteína inhibidora de la nucleasa del huésped).

El dCas9 se asocia con un sgRNA para unirse y desenrollar parcialmente unos 20 pb de interés en el genoma permitiendo así que la enzima APOBEC, con su dominio citidina desaminasa, induzca un cambio de C a U (uracilo). El cambio se produce dentro de una ventana de 3–8 pb de la secuencia de destino y esta modificación se repara posteriormente por mecanismos de reparación celular a T. APOBEC se vincula a dCas9 a través de una secuencia de enlace (*Figura 9*), y al cambiar la longitud y la composición del mismo se puede ampliar o reducir el rango de la ventana de edición, de tal modo que podría reducirse para que solo una C fuese modificada. En el caso de el sgRNA diseñado, la mutación queda en la posición 7 (*Figura 8*).

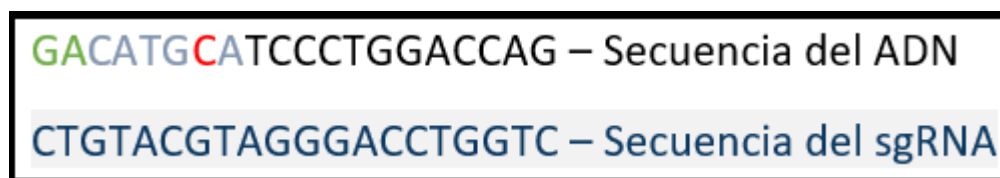


Figura 8. Ventana donde aparece la región del sgRNA homóloga al gen ABCA4. En verde aparecen los dos nucleótidos previos a la ventana de edición, en azul aparece el rango de la ventana de edición y en rojo la C que se busca reparar.

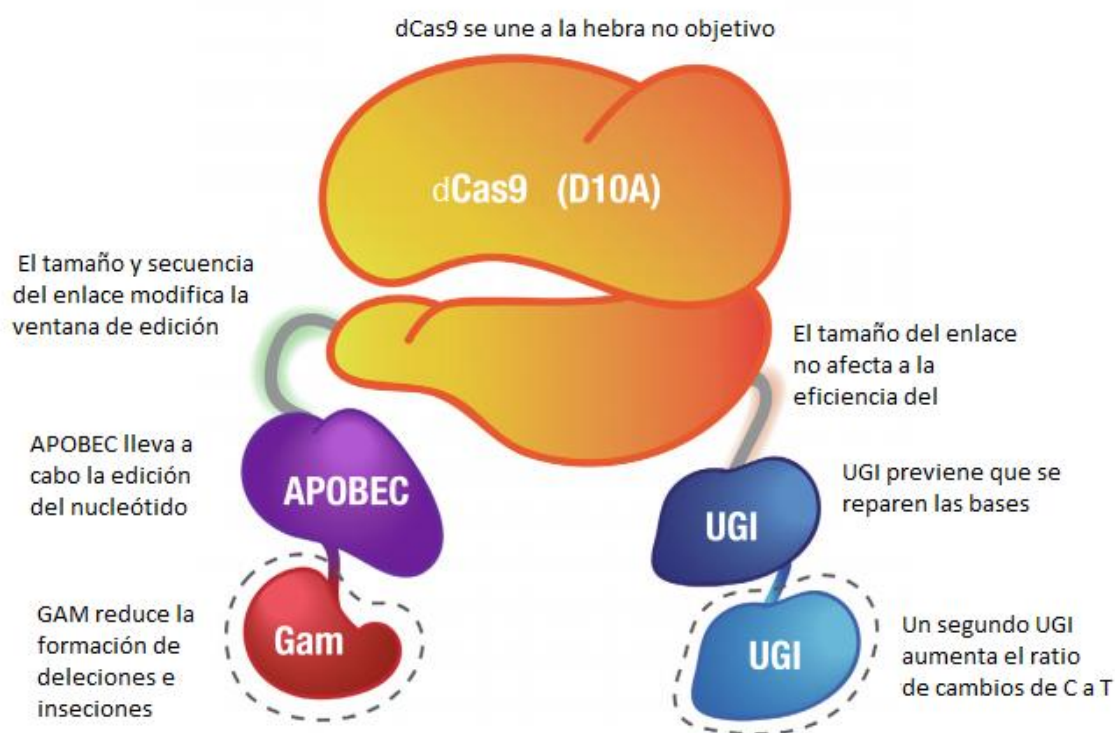


Figura 9. Esquema de los componentes del sistema de edición de bases.

Posteriormente el UGI, sirve para bloquear la enzima uracil ADN glicosilasa para que no revierta la falta de coincidencia de U:G a una C:G. Se puede agregar un segundo UGI al complejo para aumentar la frecuencia de las ediciones C a T. La adición de GAM en el extremo N reduce la frecuencia de las inserciones/deleciones en el sitio objetivo (Schatoff, Zafra y Dow, 2019). A pesar de que en la secuencia diana aparecen dos C en la ventana de 3-8p y, podría reducirse la ventana de edición de tal modo que solo afectase a la C que produce la mutación. Si esto no pudiera llevarse a cabo tampoco supondría un problema debido a que el codón donde se encuentra la primera C corresponde a “GAC” cuyo producto es el ácido aspártico y de ser modificado cambiaría a “GAT” produciéndose una mutación sinónima o silenciosa sin cambio de producto final.

4.3.3 Introducción del sgRNA y el sistema de edición en los pacientes.

La introducción de los componentes del sistema CRISPR necesitan de un vector y debido al pequeño tamaño de los componentes de esta simulación (Komor *et al.*, 2016) y a que solo se utiliza un sgRNA lo que reduce enormemente la carga de este método. Estos podrían ser introducidos en plásmidos y cargados en un único vector basado en virus adeno-asociados, o

AAV (Xu *et al.*, 2019). Los AAV se basan en el virus adenoasociado, un parvovirus no patógeno de ADN monocatenario. Cuenta con un perfil de seguridad alto y produce una expresión génica duradera, por lo que se han convertido en el vector preferido para la terapia siempre que el tamaño de los componentes permita su uso ya que solo admite 4,7kb (McDougald *et al.*, 2019). Finalmente estos se introducirían mediante una inyección directa en la retina, lo cual ya ha demostrado ser eficaz en modelos animales (Wu *et al.*, 2016; Ruan *et al.*, 2017; McDougald *et al.*, 2019; Zhang, Zhang y Yin, 2019) y es el método utilizado en un ensayo para tratar el síndrome de Leber (ClinicalTrials.gov: NCT03872479). Para la inyección, se utilizará una aguja de calibre 30 para crear un agujero cerca del limbo y se administrará 1µl de virus en el espacio subretiniano (Xu *et al.*, 2019).

5. Conclusiones

1. Cabe destacar la eficacia de CRISPR-Cas como herramienta de edición genética permitiendo realizar prácticamente cualquier tipo de edición en un genoma, con gran sencillez, versatilidad y aplicabilidad.

2. El uso de CRISPR-Cas para tratar enfermedades es muy reciente por lo que aún no es posible encontrar terapias aprobadas que los usen, pero si existen pruebas clínicas que ya están introduciendo su uso en humanos.

3. Se están realizando 25 ensayos clínicos en humanos donde destaca el uso de CRISPR-Cas sobre células sanguíneas para tratar el cáncer y para tratar enfermedades oculares y musculares debido a la facilidad de administración de los componentes en estos tejidos. Todos los ensayos se encuentran en fase I y II, de comprobación de dosis y efectividad.

4. CRISPR-Cas se muestra como una herramienta prometedora con grandes perspectivas de futuro para la erradicación de las enfermedades hereditarias u otras transmitidas por virus, ya que los primeros ensayos, sobre células T, tienen previsto acabar en junio de 2019 mientras que los que se han iniciado más recientemente tienen previsto finalizar en el año 2023.

5. Es posible diseñar un protocolo de tratamiento con CRISPR-Cas utilizando únicamente plataformas públicas lo que permite que su uso sea universal.

Conclusions

1. CRISPR-Cas is very important as a genetic editing tool allowing practically any type of editing in a genome, with great simplicity, versatility and applicability.
2. The use of CRISPR-Cas to treat diseases is very recent so it's not yet possible to find approved therapies that use them, but there are clinical tests that are already introducing their use in humans.
3. 25 human clinical trials are underway, highlighting the use of CRISPR-Cas on blood cells to treat cancer and to treat eye and muscle diseases due to the ease of administration of the components in these tissues. All the trials are in phase I and II, dose-checking and effectiveness.
4. CRISPR-Cas is shown as a promising tool with great future prospects for the eradication of hereditary diseases or other diseases transmitted by viruses. The firsts trials, on T cells, are scheduled to end in June 2019 while those they have started more recently they plan to finish in the year 2023.
5. It is possible to design a treatment protocol with CRISPR-Cas using only public platforms, which allows its use to be universal.

6. Bibliografía

Ahmad, G. and Amiji, M. (2018) Use of CRISPR/Cas9 gene-editing tools for developing models in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 23(3), pp. 519–533.

Arnold, C. R. *et al.* (2014) T cell receptor-mediated activation is a potent inducer of macroautophagy in human CD8+CD28+ T cells but not in CD8+CD28– T cells. *Experimental Gerontology*, 54, pp. 75–83.

Avela, K. *et al.* (2018) A founder mutation in CERKL is a major cause of retinal dystrophy in Finland. *Acta Ophthalmologica*, 96(2), pp. 183–191.

Bae, S., Park, J. and Kim, J. S. (2014) Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30(10), pp. 1473–1475.

Bak, R. O. and Porteus, M. H. (2017) CRISPR-Mediated Integration of Large Gene Cassettes Using AAV Donor Vectors. *Cell Reports*, 20(3), pp. 750–756.

Bhaya, D., Davison, M. and Barrangou, R. (2011) CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics*, 45(1), pp. 273–297.

Blin, K. *et al.* (2016) CRISPy-web: An online resource to design sgRNAs for CRISPR applications. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(2), pp. 118–121.

Bolotin, A. *et al.* (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), pp. 2551–2561.

Brokowski, C. and Adli, M. (2019) CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 431(1), pp. 88–101.

Brooks, A. K. and Gaj, T. (2018) Innovations in CRISPR technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 52, pp. 95–101.

Burnight, E. R. *et al.* (2017) Using CRISPR-Cas9 to Generate Gene-Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inherited Retinal Degeneration. *Molecular Therapy*, 25(9), pp. 1999–2013.

Cai, L. *et al.* (2016) CRISPR-mediated genome editing and human diseases. *Genes & Diseases*, 3(4), pp. 244–251.

Carrum, G. *et al.* (2019) Targeting Lymphomas Using Non-Engineered, Multi-Antigen-Specific T Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 25(3, Supplement), p. S20.

Chow, R. D. and Chen, S. (2018) Cancer CRISPR Screens In Vivo. *Trends in Cancer*. Elsevier Inc., 4(5), pp. 349–358.

Chu, V. T. *et al.* (2016) Efficient CRISPR-mediated mutagenesis in primary immune cells using CrispRGold and a C57BL/6 Cas9 transgenic mouse line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(44), pp. 12514–12519.

Chylinski, K. *et al.* (2014) Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), pp. 6091–6105.

Deltcheva, E. *et al.* (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), pp. 602–7.

Deveau, H., Garneau, J. E. and Moineau, S. (2010) CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), pp. 475–493.

Dhanjal, J. K., Radhakrishnan, N. and Sundar, D. (2018) CRISPCut: A novel tool for designing optimal sgRNAs for CRISPR/Cas9 based experiments in human cells. *Genomics*.

Dwivedi, S. *et al.* (2018) Chapter 22 - Genetic Engineering: Towards Gene Therapy and Molecular Medicine. in Barh, D. and Azevedo, V. B. T.-O. T. and B.-E. (eds). Academic Press, pp. 507–532.

El-Beshlawy, A. and El-Ghamrawy, M. (2019) Recent trends in treatment of thalassemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 76, pp. 53–58.

Finn, J. D. *et al.* (2018) A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Reports*. Elsevier Company., 22(9), pp. 2227–2235.

Flitton, M. *et al.* (2019) Interaction of nutrition and genetics via DNMT3L-mediated DNA methylation determines cognitive decline. *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 78, pp. 64–73.

Forest, F. *et al.* (2018) Nuclear grading, BAP1, mesothelin and PD-L1 expression in malignant pleural mesothelioma: prognostic implications. *Pathology*, 50(6), pp. 635–641.

Garneau, J. E. *et al.* (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 468, p. 67.

Gilbert, L. A. *et al.* (2013) XCRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. Elsevier Inc., 154(2), p. 442.

Graf, R. *et al.* (2019) sgRNA Sequence Motifs Blocking Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. *Cell Reports*. Elsevier Company., 26(5), p. 1098–1103.e3.

Heigwer, F., Kerr, G. and Boutros, M. (2014) E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 11(2), pp. 122–123.

Hirsch, T. *et al.* (2017) Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 551(7680), pp. 327–332.

Hong, A. (2018) CRISPR in personalized medicine: Industry perspectives in gene editing. *Seminars in Perinatology*, 42(8), pp. 501–507.

Hsu, P. D., Lander, E. S. and Zhang, F. (2014) Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), pp. 1262–1278.

IB, H. *et al.* (2015) Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 33(April).

Jansen, R. *et al.* (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 43(6), pp. 1565–1575.

Jinek, M. *et al.* (2012) A Programmable Dual-RNA – Guided. *Science*, 337(August), pp. 816–822.

Karimian, A. *et al.* (2019) CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy. *Journal of Cellular Physiology*, (August 2018), pp. 1–11.

Kim, Y. B. *et al.* (2017) Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature Biotechnology*, 35(4), pp. 371–376.

Komor, A. C. *et al.* (2016a) Letter. *Nature*. Nature Publishing Group, 533(7603), pp. 420–424.

Komor, A. C. *et al.* (2016b) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533, p. 420.

Koshkin, V. S. and Rini, B. I. (2016) Emerging therapeutics in refractory renal cell carcinoma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. Taylor & Francis, 17(9), pp. 1225–1232.

Kuscu, C. *et al.* (2017) CRISPR-STOP : gene silencing through nonsense mutations. *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 14(7), pp. 2–6.

Lattanzi, A. *et al.* (2019) Optimization of CRISPR/Cas9 Delivery to Human Hematopoietic Stem

and Progenitor Cells for Therapeutic Genomic Rearrangements. *Molecular Therapy*, 27(1), pp. 137–150.

Lee, K. *et al.* (2017) and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nature Biomedical Engineering*. Springer US, 1(November).

Li, M. and Snider, B. J. B. T.-G. T. in N. D. (eds) (2018) Subject Index. in. Academic Press, pp. 409–428.

Liu, J. and Shui, S. (2016) Delivery methods for site-specific nucleases: Achieving the full potential of therapeutic gene editing. *Journal of Controlled Release*, 244, pp. 83–97.

Loesch, R., Desbois-Mouthon, C. and Colnot, S. (2019) Potentials of CRISPR in liver research and therapy. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. Elsevier Masson SAS, 43(1), pp. 5–11.

Lu, Z. *et al.* (2011) Paclitaxel Gelatin Nanoparticles for Intravesical Bladder Cancer Therapy. *The Journal of Urology*, 185(4), pp. 1478–1483.

Marraffini, L. A. and Sontheimer, E. J. (2010) CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 11(3), pp. 181–190.

McDougald, D. S. *et al.* (2019) CRISPR Activation Enhances In Vitro Potency of AAV Vectors Driven by Tissue-Specific Promoters. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 13, pp. 380–389.

Mehat, M. S. *et al.* (2018) Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 125(11), pp. 1765–1775.

Meier, J. A., Zhang, F., & Sanjana (2017) *CORRESPONDENCE GUIDES: sgRNA design for loss-of-function screens*.

Mizuno, R. *et al.* (2019) PD-1 efficiently inhibits T cell activation even in the presence of co-stimulation through CD27 and GITR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 511(3), pp. 491–497.

Mojica, F. J. M. *et al.* (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174–182.

Mojica, F. J. M. *et al.* (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), pp. 733–740.

Musunuru, K. (2017) Genome Editing: The Recent History and Perspective in Cardiovascular Diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(22), pp. 2808–2821.

Naycheva, L. *et al.* (2013) Transcorneal electrical stimulation in patients with retinal artery occlusion: a prospective, randomized, sham-controlled pilot study. *Ophthalmology and therapy*, 2(1), pp. 25–39.

Nishida, K. *et al.* (2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems, 8729(August).

O'Brien, S. J. *et al.* (2019) CRISPR-mediated gene editing for the surgeon scientist. *Surgery*.

Pardi, N. *et al.* (2017) Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 543(7644), pp. 248–251.

Perry, D. *et al.* (2017) AAV5–Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A, pp. 1–12.

Pourcel, C., Salvignol, G. and Vergnaud, G. (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), pp. 653–663.

Raghavendra, P. and Pullaiah, T. (2018) Chapter 3 - Advancements in Genetic Applications for Cellular and Molecular Diagnostics. in Raghavendra, P. and Pullaiah, T. B. T.-A. in C. and M. D. (eds). Academic Press, pp. 57–84.

Rezvani, K. *et al.* (2017) Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Molecular Therapy*, 25(8), pp. 1769–1781.

Robinson, J. T. *et al.* (2011) Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 29, p. 24.

Rouet, P., Smih, F. and Jasin, M. (1994) Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), p. 8096 LP-8106.

Ruan, G.-X. *et al.* (2017) CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. *Molecular Therapy*, 25(2), pp. 331–341.

Salsman, J. and Dellaire, G. (2016) Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(2), pp. 187–201.

Schatoff, E. M., Zafra, M. P. and Dow, L. E. (2019) Base editing the mammalian genome.

Methods.

Singh, V., Braddick, D. and Dhar, P. K. (2017) Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. *Gene*, 599, pp. 1–18.

Smargon, A. A. *et al.* (2017) Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 65(4), p. 618–630.e7.

Spiteri Cornish, K. *et al.* (2017) The Epidemiology of Stargardt Disease in the United Kingdom. *Ophthalmology Retina*, 1(6), pp. 508–513.

Stepper, P. *et al.* (2017) Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 45(4), pp. 1703–1713.

Su, S., Liu, B. and Zou, Z. (2015) CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells for adoptive therapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. BioMed Central, 3(Suppl 2), pp. P53–P53.

Tabebordbar, M. *et al.* (2015) In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells, 5177, pp. 1–9.

Thomas, R. *et al.* (2018) NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: Current perspectives. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY).

Topalian, S. L., Drake, C. G. and Pardoll, D. M. (2015) Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 27(4), pp. 450–461.

Urnov, F. D. *et al.* (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 11(9), pp. 636–646.

Wu, W.-H. *et al.* (2016) CRISPR Repair Reveals Causative Mutation in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa. *Molecular Therapy*, 24(8), pp. 1388–1394.

Xu, L. *et al.* (2019) Life-Long AAV-Mediated CRISPR Genome Editing in Dystrophic Heart Improves Cardiomyopathy without Causing Serious Lesions in mdx Mice. *Molecular Therapy*.

Xue, W. *et al.* (2014) CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. Nature Publishing Group.

Yang, S. *et al.* (2017) CRISPR / Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington ' s disease, 127(7), pp. 2719–2724.

Yang, Y. *et al.* (2016) A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, (September 2015), pp. 1–7.

Yi, L. and Li, J. (2016) CRISPR-Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1866(2), pp. 197–207.

Yin, H., Kauffman, K. J. and Anderson, D. G. (2017) Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 16(6), pp. 387–399.

You, L. *et al.* (2019) Advancements and Obstacles of CRISPR-Cas9 Technology in Translational Research. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 13, pp. 359–370.

Yu, W. *et al.* (2017) prevents retinal degeneration in mice. *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8, pp. 1–15.

Zhan, T. *et al.* (2018) CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 55(November 2017), pp. 106–119.

Zhang, H.-X., Zhang, Y. and Yin, H. (2019) Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Molecular Therapy*.

Zheng, B. *et al.* (2017) Delay-Aware Design, Analysis and Verification of Intelligent Intersection Management. in *2017 IEEE International Conference on Smart Computing (SMARTCOMP)*, pp. 1–8.

Zuckermann, M. *et al.* (2015) tumour modelling. *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6(May), pp. 1–9.